

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07K 14/715, 16/28, C12N 15/62, A61K 39/395, 39/42, 38/17, 38/55, 31/37, 31/70</b>		<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 95/27735</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	19. Oktober 1995 (19.10.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP95/00573</b>		Kirstin [DE/DE]; Zeppelinstrasse 66, D-69120 Heidelberg (DE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 16. Februar 1995 (16.02.95)		(74) Anwalt: DEUFEL, Paul; Müller-Boré & Partner, Grafinger Strasse 2, D-81671 München (DE).	
(30) Prioritätsdaten: P 44 12 177.6 8. April 1994 (08.04.94) DE		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRAMMER, Peter [DE/DE]; Werderstrasse 11, D-69120 Heidelberg (DE). WESTEN- DORP, Michael [DE/DE]; Ladenburger Strasse 55, D-69120 Heidelberg (DE). SCHULZE-OSTHOFF, Klaus [DE/DE]; Goethestrasse 66, D-69221 Dossenheim (DE). DEBATIN, Klaus-Michael [DE/DE]; Uferstrasse 22a, D-69120 Heidel- berg (DE). FRANK, Rainer [DE/DE]; Hans-Thoma-Strasse 76, D-69120 Heidelberg (DE). DHEIN, Jens [DE/DE]; Wichernstrasse 8, D-68535 Edingen-Neckarhausen (DE). WALCZAK, Henning [DE/DE]; Hagellachstrasse 35, D- 69124 Heidelberg (DE). KNIPPING, Eckart [DE/DE]; Zep- pelinstrasse 66, D-69120 Heidelberg (DE). STRICKER,			

(54) Title: APOPTOSE INHIBITOR

(54) Bezeichnung: HEMMER VON APOPTOSE

(57) Abstract

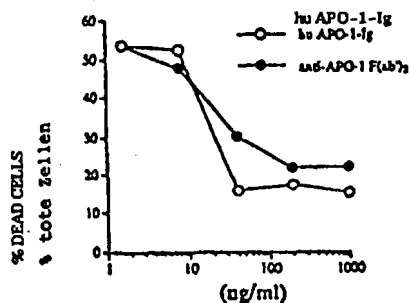
The invention concerns an apoptosis-inhibiting agent containing one, two or all of the following components: a) a compound which inhibits APO-1; b) a compound which inhibits or intercepts the APO-1 ligand; and c) a compound which inhibits the intra-cellular APO-1 signal path, the component(s) not being considered as foreign in an individual, plus the usual auxiliaries. The invention also concerns a compound, suitable for use in inhibiting apoptosis, with at least one extra-cellular APO-1 domain and a carrier, the domain(s) and the carrier not being considered as foreign in an individual.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Hemmung von Apoptose, enthaltend eine bis alle Komponenten von a) eine APO-1 hemmende Verbindung; b) eine den APO-1-Ligand hemmende bzw. abfangende Verbindung; und c) eine den intrazellulären APO-1-Signalweg hemmende Verbindung, wobei die Komponente(n) in einem Individuum nicht als fremd angesehen wird (werden), sowie übliche Hilfsstoffe. Ferner betrifft die Erfindung eine zur Hemmung von Apoptose geeignete Verbindung mit mindestens einer extrazellulären APO-1-Domäne und einem Träger, wobei die Domäne(n) und der Träger in einem Individuum nicht als fremd angesehen werden.

INHIBITION BY hu APO-1-Ig AND  
ANTI-APO-1F(ab)<sub>2</sub> OF APOPTOSIS  
INDUCED BY ANTI-APO-1 ANTIBODIES  
IN SKW6.4 CELLS.

Hemmung der bei SKW6.4 Zellen  
mittels anti-APO-1-Antikörper (20 ng/ml)  
induzierten Apoptose durch  
hu APO-1-Ig bzw. anti-APO-1 F(ab')<sub>2</sub>.



INHIBITION OF APOPTOSIS BY hu APO-1-Ig AND ANTI-APO-1-Ig(ab)<sub>2</sub>  
Hemmung von Apoptose durch hu APO-1-Ig bzw. anti-APO-1-Ig(ab')<sub>2</sub>

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

## HEMMER VON APOPTOSE

Die Erfindung betrifft Mittel zur Hemmung von Apoptose. Ferner betrifft die Erfindung Verbindungen, die sich zur Hemmung von Apoptose eignen, sowie Verfahren zu deren Herstellung.

5 Apoptose ist die Bezeichnung für programmierten Zelltod. Dieser findet sich, z.B. bei der Organentwicklung und Metamorphose, der Gewebeatrophie und Tumorre-  
gression. Apoptose ist mit einer Kondensation des Cytoplasmas, einem Verlust von  
Plasmamembranvilli, einer Segmentation des Kerns und extensivem Abbau chro-  
mosomaler DNA verbunden (vgl. Oehm, A. et al., The Journal of Biological Chemi-  
10 stry, Band 267, Nr. 15 (1992), Seiten 10709-10715).

In Zellen, die für Apoptose positiv sind, findet sich oftmals ein mit APO-1 bezeich-  
netes Zell-Oberflächenprotein. Dieses Glycoprotein wird der Tumornekrosefaktor-  
/Nervenzwachstumsfaktor-Rezeptor-Familie zugerechnet. Durch Crosslinking von  
15 APO-1 über einen anti-APO-1-Antikörper wird Apoptose bei den genannten Zellen  
induziert (vgl. Oehm, A. et al., supra). Gleiches scheint auch durch Bindung eines  
mit APO-1-Ligand bezeichneten löslichen oder Membran-gebundenen Proteins an  
APO-1 bewirkt zu werden (vgl. Suda, T. und Nagata, S., J. Exp. Med., The Rocke-  
feller University Press, Band 179 (1994), Seiten 873-879).

20 Über die Hemmung von Apoptose ist dagegen nichts bekannt. Dies wäre aber  
umso notwendiger, da jüngste Arbeiten des Anmelders zeigen, daß Apoptose auch  
bei verschiedenen Erkrankungen, wie AIDS und Autoimmunerkrankungen, auftritt.  
Bei AIDS scheint Apoptose für die starke Abnahme der CD4-T Zellen verantwort-  
25 lich zu sein.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzu-  
stellen, mit dem Apoptose gehemmt werden kann.

30 Erfindungsgemäß wird dies durch Bereitstellung eines Mittels erreicht, das sich  
dadurch auszeichnet, daß es eine bis alle Komponenten enthält von:

- (a) eine APO-1 hemmende Verbindung,
- (b) eine den APO-1-Ligand hemmende bzw. abfangende Verbindung, und
- (c) eine den intrazellulären APO-1-Signalweg hemmende Verbindung, wobei die Komponente(n) in einem Individuum nicht als fremd angesehen wird (werden), sowie übliche Hilfsstoffe.

Der Ausdruck "APO-1 hemmende Verbindung" umfaßt jegliche zur Hemmung von APO-1 geeignete Verbindung. Vorzugsweise ist dies ein blockierender, nicht-cytotoxischer anti-APO-1-Antikörper oder ein anti-APO-1-Antikörper ohne Fc-Teil, z.B. ein F(ab)-, F(ab)<sub>2</sub>- oder F<sub>v</sub>-Fragment eines anti-APO-1-Antikörpers. Die Herstellung eines solchen Fragments erfolgt in üblicher Weise, wobei der Fachmann z.B. von dem in Oehm et al., supra beschriebenen anti-APO-1-Antikörper oder von dem in Dhein, J. et al., The Journal of Immunology, Band 149, Nr. 10, (1992), Seiten 3166-3173 beschriebenen anti-APO-1-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment ausgeht. Letzteres kann auch direkt eingesetzt werden.

Das Fehlen des Fc-Teils in vorstehendem Antikörper verhindert das Crosslinking von gebundenem APO-1 und somit die Induktion von Apoptose. Überraschenderweise wird APO-1 durch einen solchen Antikörper gehemmt.

Als weitere bevorzugte "APO-1 hemmende Verbindung" ist ein APO-1-Ligand-Analogon zu nennen. Ein solches bindet nach wie vor an APO-1, induziert jedoch nicht mehr den intrazellulären APO-1-Signalweg. Die Herstellung eines solchen Analogons erfolgt in üblicher Weise, wobei der Fachmann z.B. von dem in Suda, T. und Nagata, S., supra beschriebenen APO-1-Ligand ausgeht.

Der Ausdruck "APO-1-Ligand hemmende bzw. abfangende Verbindung" umfaßt jegliche zur Hemmung bzw. zum Abfangen des APO-1-Ligand geeignete Verbindung. Vorzugsweise ist dies eine der folgenden Verbindungen:

- ein anti-APO-1-Ligand-Antikörper,
- ein APO-1,
- eine extrazelluläre APO-1-Domäne,

- eine Verbindung mit mindestens einer extrazellulären APO-1-Domäne und einem Träger,
- ein eine APO-1-Ligand-Bindungsstelle aufweisendes Peptid, und
- eine Verbindung mit mindestens einem eine APO-1-Ligand-Bindungsstelle aufweisenden Peptid und einem Träger.

5

Die Herstellung einer solchen Verbindung erfolgt in üblicher Weise. Der Fachmann wird zur Herstellung eines anti-APO-1-Ligand-Antikörpers z.B. von dem in Suda, T. und Nagata, S., supra beschriebenen APO-1-Ligand ausgehen. Er wird darauf achten, daß der Fc-Teil des Antikörpers in einem Individuum nicht als fremd angesehen wird. Verfahren, die dies ermöglichen, sind ihm bekannt. Ferner wird der Fachmann hinsichtlich der Herstellung von APO-1 bzw. einer extrazellulären APO-1-Domäne z.B. von dem in der EP-92 107 060.3 beschriebenen APO-1 bzw. seiner extrazellulären Domäne ausgehen. Desweiteren wird er zur Herstellung eines

10  
15  
eine APO-1-Ligand-Bindungsstelle aufweisenden Peptids z.B. die Kombination aus vorstehendem APO-1-Ligand und vorstehendem APO-1 bzw. seiner extrazellulären Domäne nutzen.

Die Herstellung einer Verbindung mit mindestens einer extrazellulären APO-1-Domäne und einem Träger wird nachstehend beispielhaft beschrieben. In analoger Weise kann eine Verbindung mit mindestens einem eine APO-1-Ligand-Bindungsstelle aufweisenden Peptid und einem Träger hergestellt werden.

20

Der Ausdruck "eine den intrazellulären APO-1-Signalweg hemmende Verbindung" umfaßt jegliche zur Hemmung des intrazellulären APO-1-Signalwegs geeignete Verbindung. Vorzugsweise ist dies eine der folgenden Verbindungen:

25

- ein Hemmer des "interleukin-1 $\beta$  converting enzyme" (ICE), insbesondere 3,4-Dichlorisocoumarin (DCI), YVAD-CHO, ein ICE-spezifisches Tetrapeptid, oder CrmA, ein Protein von Vaccinia-Virus bzw. Derivate davon. Günstig kann es sein, YVAD-CHO oder CrmA bzw. Derivate davon als exprimierbare Nukleinsäuren zu verwenden. Ferner kann es günstig sein, eine ICE-anti-Sinn

30

Nukleinsäure bzw. ein Derivat davon als ICE-Hemmer zu verwenden.

- ein Hemmer von ICE Struktur-verwandten Proteasen, insbesondere von Nedd-2/Ich-1 oder priCE.

5

Die Herstellung einer solchen Hemmer-Verbindung erfolgt in üblicher Weise. Der Fachmann wird zur Herstellung von DCI bzw. einem Derivat davon z.B. auf die Arbeit von Harper, J.W. et al., Biochemistry, 24, 1831 - 1841, (1985) zurückgreifen. Ferner wird er hinsichtlich YVAD-CHO bzw. eines Derivats davon z.B. die Arbeit von Thornberry, N.A. et al., Nature 356, 768 - 774, (1992) heranziehen. Desweiteren wird er bezüglich CrmA oder eines Derivats davon z.B. auf die Arbeit von Ray, C.A. et al., Cell 69, 597 - 604, (1994) zurückgreifen. Darüber hinaus wird er hinsichtlich der ICE-Anti-Sinn-Nukleinsäure bzw. eines Derivats davon z.B. die Arbeit von Cerretti et al., Science 256, 97 - 100, (1992) heranziehen. Im weiteren wird er bezüglich der Proteasen Nedd-2/Ich-1 bzw. priCE z.B. auf die Arbeit von Wang, L. et al., Cell 78, 739 - 750, (1994) bzw. von Lazebnik, Y. A. et al., Nature 371, 346 - 347, (1994) zurückgreifen.

10

15

20

Erfindungsgemäß wird vorstehendes Mittel besonders zur Hemmung von Apoptose bei einer mit einer HIV-Infektion assoziierten Erkrankung eingesetzt. Als besonders vorteilhaft erweist sich das Mittel dabei, wenn es ferner eine bis alle Komponenten enthält von:

- (a) eine den TAT-Rezeptor hemmende Verbindung,
- (b) eine TAT hemmende bzw. abfangende Verbindung,
- (c) eine den intrazellulären TAT-Rezeptor-Signalweg hemmende Verbindung,
- (d) eine den CD4-Rezeptor hemmende Verbindung,
- (e) eine gp120 hemmende bzw. abfangende Verbindung, und
- (f) eine den intrazellulären CD4-Rezeptor-Signalweg hemmende Verbindung, wobei die Komponente(n) in einem Individuum nicht als fremd angesehen wird(werden).

25

30

Der Ausdruck "eine den TAT-Rezeptor hemmende Verbindung" umfaßt jegliche zur

Hemmung des TAT-Rezeptors geeignete Verbindung. Vorzugsweise ist dies ein anti-TAT-Rezeptor-Antikörper. Die Herstellung eines solchen erfolgt in üblicher Weise. Der Fachmann wird darauf achten, daß der Fc-Teil des Antikörpers in einem Individuum nicht als fremd angesehen wird. Verfahren, die dies ermöglichen, sind dem Fachmann bekannt.

Als weitere bevorzugte "den TAT-Rezeptor hemmende Verbindung" ist ein TAT-Analogon zu nennen. Ein solches bindet nach wie vor an den TAT-Rezeptor, induziert jedoch nicht mehr den intrazellulären TAT-Rezeptor-Signalweg. Die Herstellung eines solchen Analogons erfolgt in üblicher Weise, wobei der Fachmann z.B. von dem in Arya, S., K., et al., Science, Band 229 (1985), Seiten 69-73 beschriebenen TAT ausgeht.

Der Ausdruck "eine TAT-hemmende bzw. abfangende Verbindung" umfaßt jegliche zur Hemmung bzw. zum Abfangen von TAT geeignete Verbindung. Vorzugsweise ist dies eine der folgenden Verbindungen:

- ein anti-TAT-Antikörper,
- ein TAT-Rezeptor,
- eine extrazelluläre TAT-Rezeptor-Domäne,
- eine Verbindung mit mindestens einer extrazellulären TAT-Rezeptor-Domäne und einem Träger,
- ein eine TAT-Bindungsstelle aufweisendes Peptid,
- eine Verbindung mit mindestens einem eine TAT-Bindungsstelle aufweisenden Peptid und einem Träger,
- eine TAT-Bindungsstelle auf Nukleinsäurebasis, und
- eine transdominante TAT-Mutante.

Die Herstellung einer solchen Verbindung erfolgt in üblicher Weise. Der Fachmann wird zur Herstellung eines anti-TAT-Antikörpers z.B. von dem in Arya, S., K. et al., supra beschriebenen TAT ausgehen. Er wird darauf achten, daß der Fc-Teil des Antikörpers in einem Individuum nicht als fremd angesehen wird. Verfahren, die das ermöglichen, sind ihm bekannt. Ferner wird er hinsichtlich einer TAT-Bindungs-

stelle auf Nukleinsäurebasis z.B. von der in Feng, S. und Holland, E., C., Nature, Band 334 (1988), Seiten 165-167 beschriebenen TAT-LTR-Sequenz ausgehen. Desweiteren wird der Fachmann bezüglich einer transdominanten TAT-Mutante z.B. von der in Echeteu, C., O. und Rice, A., P., J. Acquir. Immune Def. Syn-  
5 drome, Band 6, (1993), Seiten 550-557 beschriebenen Mutante ausgehen.

Der Ausdruck "eine den intrazellulären TAT-Rezeptor-Signalweg hemmende Verbindung" umfaßt jegliche zur Hemmung des intrazellulären TAT-Rezeptor-Signalwegs geeignete Verbindung.

Der Ausdruck "eine den CD4-Rezeptor hemmende Verbindung" umfaßt jegliche zur Hemmung des CD4-Rezeptors geeignete Verbindung. Vorzugsweise ist dies ein anti-CD4-Rezeptor-Antikörper. Die Herstellung eines solchen erfolgt in üblicher Weise, wobei der Fachmann z.B. von dem in Capon, D., J. und Ward, R., H., R.,  
15 Annu. Rev. Immunol. 9, (1991), Seiten 649-678, beschriebenen CD4-Rezeptor ausgeht. Der Fachmann wird darauf achten, daß der Fc-Teil des Antikörpers in einem Individuum nicht als fremd angesehen wird. Verfahren, die das ermöglichen, sind dem Fachmann bekannt.

Als weitere bevorzugte "den CD4-Rezeptor hemmende Verbindung" ist ein gp 120-Analagon zu nennen. Ein solches bindet nach wie vor an den CD4-Rezeptor, induziert jedoch nicht mehr den intrazellulären CD4-Rezeptor-Signalweg. Die Herstellung eines solchen Analogons erfolgt in üblicher Weise, wobei der Fachmann z.B. von dem in Capon, D., J. und Ward, R., H., R., supra beschriebenen gp 120  
25 ausgeht.

Der Ausdruck "eine gp 120 hemmende bzw. abfangende Verbindung" umfaßt jegliche zur Hemmung bzw. Abfangung von gp 120 geeignete Verbindung. Vorzugsweise ist dies eine der folgenden Verbindungen:

- ein anti-gp 120-Antikörper,
- ein CD4-Rezeptor,
- eine extrazelluläre CD4-Rezeptor-Domäne,



- eine Verbindung mit mindestens einer extrazellulären CD4-Rezeptor-Domäne und einem Träger,
- ein eine gp 120-Bindungsstelle aufweisendes Peptid, und
- eine Verbindung mit mindestens einem eine gp 120-Bindungsstelle aufweisenden Peptid und einem Träger.

5

Die Herstellung einer solchen Verbindung erfolgt in üblicher Weise. Der Fachmann wird zur Herstellung eines anti-gp 120-Antikörpers z.B. von dem in Capon, D.J. und Ward, R., H., R., supra beschriebenen gp 120 ausgehen. Er wird darauf achten, daß der Fc-Teil des Antikörpers in einem Individuum nicht als fremd angesehen wird. Verfahren, die das ermöglichen, sind ihm bekannt. Ferner wird der Fachmann hinsichtlich der Herstellung eines CD4-Rezeptors bzw. einer extrazellulären CD4-Rezeptor-Domäne z.B. von dem in Capon, D., J. und Ward, R., H., R., supra beschriebenen CD4-Rezeptor bzw. seiner extrazellulären Domäne ausgehen. Desweiteren wird er zur Herstellung eines eine gp 120-Bindungsstelle aufweisenden Peptids z.B. die Kombination aus vorstehendem gp120 und vorstehendem CD4-Rezeptor bzw. seiner extrazellulären Domäne nutzen.

10

15

Die Herstellung einer Verbindung mit mindestens einer extrazellulären CD4-Rezeptor-Domäne bzw. einem mindestens eine gp 120-Bindungsstelle aufweisenden Peptid und einem Träger kann in analoger Weise erfolgen, wie nachstehend für eine Verbindung mit mindestens einer extrazellulären APO-1-Domäne und einem Träger beschrieben.

20

25

Der Ausdruck "eine den intrazellulären CD4-Rezeptor-Signalweg hemmende Verbindung" umfaßt jegliche zur Hemmung des intrazellulären CD4-Rezeptor-Signalwegs geeignete Verbindung.

30

Es wird verstanden, daß ein vorstehendes Mittel ein bis mehrere Verbindungen einer einzelnen Komponente aufweisen kann.

Erfindungsgemäß wird auch eine Verbindung mit mindestens einer extrazellulären

APO-1-Domäne und einem Träger bereitgestellt, wobei die Domäne(n) und der Träger in einem Individuum nicht als fremd angesehen werden.

Der Ausdruck "Träger" umfaßt jegliche Verbindung, an die ein oder mehrere extrazelluläre APO-1 Domänen gebunden sein können.

In bevorzugter Ausführungsform ist der Träger ein Protein, z.B. Serumalbumin, Hämoglobin, Fibrinogen, Kollagen oder ein Fc-Teil eines Antikörpers, wobei letzteres bevorzugt ist. In ganz bevorzugter Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Verbindung ein Fusionsprotein.

Eine erfindungsgemäße Verbindung kann in üblicher Weise hergestellt werden. Im Falle eines Fusionsproteins erweist sich das folgende Herstellungsverfahren als günstig:

- (a) Amplifikation einer DNA durch übliche PCR-Technik, wobei die DNA für mindestens eine extrazelluläre APO-1-Domäne und eine am 3'-Ende dieser angebrachte Bindungsregion codiert,
- (b) Amplifikation einer DNA durch übliche PCR-Technik, wobei die DNA für einen Protein-Träger und eine am 5'-Ende des Protein-Trägers angebrachte Bindungsregion codiert,
- (c) Vereinigung der amplifizierten DNAs von (a) und (b) und weitere gemeinsame Amplifikation dieser durch übliche PCR-Technik, wobei ein dem 5'-Ende der DNA der APO-1-Domäne entsprechender Primer und ein dem 3'-Ende der DNA des Protein-Trägers entsprechender Primer verwendet werden, wodurch ein amplifiziertes, beide DNAs in Fusion enthaltendes DNA-Fragment erhalten wird, und
- (d) Insertion des DNA-Fragments von (c) in einen Expressionsvektor und Expression des DNA-Fragments in üblicher Weise.

In bevorzugter Ausführungsform ist die Bindungsregion von (a) und (b) eine Antikörper-Hinge-Region oder ein Teil davon. Ferner kann sie auch eine Thrombin-

spaltstelle sein.

In vorstehendem Herstellungsverfahren werden verschiedene DNAs durch übliche PCR-Technik amplifiziert. Als DNA, die für mindestens eine extrazelluläre APO-1-Domäne codiert, wird der Fachmann z.B. die in der EP-92 107 060.3, supra beschriebene DNA als Basis verwenden. Dieser wird er am 3'Ende eine für eine Bindungsregion codierende DNA anfügen. Im Falle einer für eine Hinge-Region eines humanen Antikörpers oder einen Teil davon codierenden DNA wird der Fachmann z.B. auf die in Dübel, S., et al., Methods in Molecular and Cellular Biology, Band 3 (1992), Seiten 47-52 beschriebene DNA zurückgreifen. Hinsichtlich der für den Protein-Träger, z.B. Fc-Teil eines humanen Antikörpers, codierenden DNA wird der Fachmann z.B. ebenso auf die in Dübel, S. et al., supra beschriebene DNA zurückgreifen.

Die Expression des amplifizierten DNA-Fragments erfolgt in üblichen Vektoren, wie pCDN83, pCEV4 und pCDM8 zur Expression in tierischen Zellen, pGEMEX und pUC zur Expression in E. coli., sowie pY100 und YCpAD1 zur Expression in Hefe. Als tierische Zellen eignen sich insbesondere L-, COS- und CHO-Zellen, während als prokaryotische Mikroorganismen insbesondere E. coli-Stämme und als Hefezellen besonders solche von Saccharomyces und Pichia pastoris zu nennen sind.

Eine erfindungsgemäße Verbindung eignet sich bestens zur Hemmung von Apoptose. Sie kann hierzu allein oder in Kombination mit einer bis allen Komponenten verwendet werden, von:

- (a) eine APO-1 hemmende Verbindung,
- (b) eine weitere den APO-1-Ligand hemmende bzw. abfangende Verbindung,
- (c) eine den intrazellulären APO-1-Signalweg hemmende Verbindung, wobei die Komponente(n) in einem Individuum nicht als fremd angesehen wird(werden).

Es wird auf vorstehende Ausführungen bezüglich der einzelnen Komponenten (a),

(b) und (c) verwiesen. Diese Ausführungen gelten hier entsprechend.

Eine erfindungsgemäße Verbindung eignet sich insbesondere zur Hemmung von Apoptose bei einer mit einer HIV-Infektion assoziierten Erkrankung. Die erfindungsgemäße Verbindung kann hierzu allein oder in Kombination mit einer bis allen

5 Komponenten verwendet werden, von:

- (a) eine APO-1 hemmende Verbindung,
- (b) eine weitere den APO-1-Ligand hemmende bzw. abfangende Verbindung,
- 10 (c) eine den intrazellulären APO-1-Signalweg hemmende Verbindung,
- (d) eine den TAT-Rezeptor hemmende Verbindung,
- (e) eine TAT-hemmende bzw. abfangende Verbindung,
- (f) eine den intrazellulären TAT-Rezeptor-Signalweg hemmende Verbindung,
- 15 (g) eine den CD4-Rezeptor hemmende Verbindung,
- (h) eine gp120 hemmende bzw. abfangende Verbindung, und
- (i) eine den intrazellulären CD4-Rezeptor-Signalweg hemmende Verbindung, wobei die Komponente(n) in einem Individuum nicht als fremd angesehen wird(werden).

20 Es wird auf vorstehende Ausführungen bezüglich der einzelnen Komponenten (a) - (i) verwiesen, wobei die Komponenten (d) - (i) vorstehend mit (a) - (f) bezeichnet sind. Die vorstehenden Ausführungen gelten hier entsprechend.

25 Die vorliegende Erfindung eröffnet einen neuen Weg, Erkrankungen zu therapieren, bei denen Apoptose spezieller Zellen eine wichtige Rolle spielt. Insbesondere für die Therapie von AIDS stellt die vorliegende Erfindung einen Durchbruch dar.

30 Kurze Beschreibung der Zeichnung:

Fig. 1 zeigt die Hemmung von Apoptose durch hu APO-1-Ig bzw. anti-APO-

1F(ab')<sub>2</sub>,

Fig. 2a zeigt die Stimulierung der proteolytischen Aktivität von ICE durch einen anti-APO-1-Antikörper,

5 Fig. 2b zeigt die Hemmung von Apoptose durch DCI,

Fig. 2c zeigt die Hemmung von Apoptose durch YVAD-CHO, und

Fig. 2d zeigt die Hemmung von Apoptose durch anti-Sinn ICE- bzw. CrmA-cDNA.

10

Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Herstellung eines Fusionsproteins, in dem eine extrazelluläre APO-1-Domäne über eine Antikörper-Hinge-Region an einen Fc-Teil eines humanen Antikörpers fusioniert ist.

15

Zur Herstellung vorstehenden Fusionsproteins wurden eine eine extrazelluläre APO-1-Domäne codierende cDNA (vgl. Oehm, A. et al., supra) und eine einen Fc-Teil eines humanen Antikörpers codierende cDNA (vgl. Dübel, S. et al., supra) einer üblichen PCR-Amplifikation unterzogen.

20

Als Primer für die cDNA der extrazellulären APO-1-Domäne wurden verwendet: 5' GCG AAG CTT GCC ACC ATG GTG GGC ATC TGG ACC CTC 3', wodurch eine Hind III-Stelle upstream einer vollständigen das Initiator-Methionin umgebenden Kozak-Consensus-Region eingeführt wird, und 5' GAC ACA ACA TTT GCG CTC GTT AGA TCT GGA TCC TTC 3', der für das 3'-Ende der extrazellulären APO-1-Domäne und die ersten 18 bp der Hinge-Region codiert.

25

Als Primer für die cDNA des Fc-Teils wurden verwendet:

30

5' GAG CGC AAA TGT TGT GTC GAG TGC 3', der für die ersten 18 bp der Hinge-Region und das 5'-Ende des Fc-Teils codiert, und 5' ATT AAG CAT TCT AGA TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA 3', der für das 3'-Ende des Fc-Teils codiert und

eine XbaI-Stelle downstream des Stopcodons einführt.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem "low melting point"-Agarosegel aufgetrennt und die Gelstückchen, die DNA-Moleküle richtiger Größe enthielten, wurden vereinigt. Mit einer Probe davon wurde eine weitere PCR-Amplifikation durchgeführt. Als Primer wurden nur jene vorstehenden verwendet, die dem 5'-Ende der extrazellulären APO-1-Domäne bzw. dem 3'-Ende des Fc-Teils entsprechen. Damit war es möglich, die extrazelluläre APO-1-Domäne über die gemeinsame Hinge-Region an den Fc-Teil zu fusieren. Es wurde ein "Fusions"-DNA-Fragment erhalten.

Dieses Fragment wurde mit HindIII und XbaI gespalten, über ein Agarosegel gereinigt und in dem Vektor pCDM8 kloniert. Die Sequenz des Inserts von pCDM8 wurde durch Dideoxynukleotid-Sequenzierung bestimmt.

**Beispiel 2:            Hemmung von Apoptose durch hu APO-1-Ig bzw. anti-APO-1F(ab')<sub>2</sub>**

SKW 6.4 Zellen (vgl. Oehm, A. et al., supra) sind Apoptose-positive Zellen, d.h. bei ihnen kann Apoptose induziert werden, z.B. durch Bindung eines anti-APO-1-Antikörpers.

SKW 6.4 Zellen wurden 24 h mit einem anti-APO-1-Antikörper in Gegenwart verschiedener Mengen des Fusionsproteins von Beispiel 1 (hu APO-1-Ig) bzw. von anti-APO-1-F(ab)<sub>2</sub> (vgl. vorstehend) inkubiert. Die Hemmung der Apoptose wurde bestimmt (vgl. Figur 1).

Es zeigte sich, daß das Fusionsprotein von Beispiel 1 und anti-APO-1-F(ab)<sub>2</sub> eine starke Apoptose-Hemmungs-Wirkung aufweisen. Diese ist bei dem Fusionsprotein besonders stark.

**Beispiel 3: Hemmung von Apoptose durch DCI, YVAD-CHO, Anti-Sinn ICE- bzw. CrmA-cDNA**

5 L 929-APO-1 Zellen (vgl. Schulze-Osthoff, K. et al., EMBO J. 13, 4587-459, (1994)) sind wie SKW 6.4 Zellen von Beispiel 2 Apoptose-positiv.

**(a) Stimulierung der proteolytischen Aktivität von ICE durch einen anti-APO-1-Antikörper**

10 L 929-APO-1 Zellen (○) und SKW 6.4 Zellen (●) wurden kultiviert und mit anti-APO-1-Antikörper (1 µg/ml) für die in Fig. 2a angegebenen Zeiten behandelt. 10 Minuten bevor die Zellen geerntet wurden, wurden sie mit 0,05 % Digitonin permeabilisiert und mit 20 µM des fluorogenen ICE-Substrats DABCYL-YVADAP-EDANS (Bachem, Bubendorf, Schweiz) inkubiert. Die  
15 Zellen wurden geerntet und durch eine FACS-Analyse unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 488 nm analysiert.

20 Es zeigte sich, daß die proteolytische Aktivität von ICE durch einen anti-APO-1-Antikörper stimuliert werden kann.

**(b) Hemmung einer anti-APO-1-Antikörper induzierten Apoptose durch DCI**

25 L 29-APO-1 Zellen wurden mit DCI (● 45 µM, ▲ 15 µM) oder ohne DCI (○) inkubiert. Nach einer Stunde wurde anti-APO-1 Antikörper in den in Fig. 2b angegebenen Mengen zugegeben und 7 Stunden auf den Zellen gelassen. Der prozentuale Zelltod wurde durch Formazan-Produktion aus Diphenyltetrazoliumsalz (MTT-Assay) bestimmt.

30

Es zeigte sich, daß eine anti-APO-1-Antikörper induzierte Apoptose durch DCI gehemmt werden kann.

(c) **Hemmung einer anti-APO-1-Antikörper induzierten Apoptose durch YVAD-CHO**

5

10

15

L 29-APO-1 Zellen (○) und SKW6.4 Zellen (●) wurden durch einen kurzen hypotonischen Schock permeabilisiert und mit den in Fig. 2c angegebenen Konzentrationen von YVAD-CHO 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden mit anti-APO-1 Antikörper (1 µg/ml) 60 Minuten inkubiert. Apoptose wurde bestimmt, indem eine DNA-Fragmentation mit dem Höchst-Farbstoff 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR) gemessen wurde. Daten spezifischen Zelltods (Zelltod in Gegenwart eines anti-APO-1 Antikörpers minus Zelltod in Abwesenheit eines solchen Antikörpers) wurden aus Dreifach-Messungen erhalten, indem ein FACS Vantage-Flußzytometer verwendet wurde. Spontaner Zelltod in Abwesenheit eines anti-APO-1 Antikörpers betrug weniger als 7 %.

20

Es zeigte sich, daß eine anti-APO-1-Antikörper induzierte Apoptose durch YVAD-CHO gehemmt werden kann.

(d) **Hemmung einer anti-APO-1-Antikörper induzierten Apoptose durch anti-Sinn ICE- bzw. CrmA-cDNA**

25

Folgende Expressionsplasmide wurden hergestellt:

**pCAGGS-ICE**

30

Eine Maus-ICE cDNA wurde durch RT-PCR isoliert, indem EL-4/c mRNA und oligo dT-Primer für die erste Strangsynthese verwendet wurden. Durch das Primerpaar 5'-ATCGGATCCAGCATGGCTGACAAGATCCTGAGG-3' und 5'-CGGCCTCGAGCATCATCTAAGGAAGTATTGGC-3' wurde ein 1322 bp



PCR-Produkt erhalten, das als Probe zum Screening einer in pCAGGS (vgl. Niwa, H. et al., Gene 108, 193 - 200 (1994)) klonierten E14/13 cDNA Expressions-Genbank verwendet wurde. Es wurde ein 1387 bp ICE cDNA Klon erhalten, dessen Sequenz durch DNA-Sequenzierung bestimmt wurde. Dieser Klon wurde mit pCAGGS-ICE bezeichnet.

#### pCAGGS-anti-Sinn ICE

In pCAGGS wurde ein 320 bp EcoRI-Fragment der vorstehenden ICE cDNA in umgekehrter Orientierung kloniert, wobei das Fragment 48 bp der 5' UTR und die ersten 255 bp des ICE-ORF enthielt. Es wurde das Expressionsplasmid pCAGGS-anti-Sinn ICE erhalten.

#### pSV25S-CrmA

In einer üblichen PCR wurde durch Verwendung des Primerpaares 5'-GC-GAAGCTTACACGACCAATATCGATTACTA-3' und 5'-CGCCATGGTTAA-CAATTAGTTGTCGGAGAG-3' aus Vaccinia-Virus DNA eine für CrmA codierende cDNA erhalten. Diese cDNA wurde als HindIII/KpnI-Fragment in das bekannte Plasmid pSV25S kloniert. Es wurde das Expressionsplasmid pSV25S-CrmA erhalten.

Die vorstehenden Expressionsplasmide wurden zur Transfektion von L 929-APO-1 Zellen verwendet. Hierzu wurden die Zellen in TBS-Puffer aufgenommen und 10 Minuten auf Eis äquilibriert. Die Zellen wurden jeweils mit 20 µg vorstehender Expressionsplasmide transfiziert, indem ein Biorad-Elektroporator (960 µFD, 220 V) verwendet wurde. Nach der Elektroporation wurden die Zellen weitere 30 Minuten auf Eis gehalten, bevor sie in Zellkulturplatten ausgesät wurden. Tote Zellen wurden nach 16 Stunden durch einen Waschschrift entfernt. Lebende Zellen wurden mit anti-APO-1-Antikörper (1µg/ml) für die in Fig. 2d angegebenen Zeiten behandelt. Apoptose wurde, wie vorstehend beschrieben, durch FACS-Analyse bestimmt, wobei

der Hoechst-Farbstoff 33342 verwendet wurde. Daten wurden als prozentualer Zelltod aus Zweifach-Experimenten ermittelt.

5

Es zeigte sich, daß eine anti-APO-1-Antikörper induzierte Apoptose durch anti-Sinn ICE bzw. CrmA gehemmt werden kann.

## Patentansprüche

- 5 1. Mittel zur Hemmung von Apoptose, enthaltend eine bis alle Komponenten von:
- 10 (a) eine APO-1 hemmende Verbindung,  
(b) eine den APO-1-Ligand hemmende bzw. abfangende Verbindung, und  
(c) eine den intrazellulären APO-1-Signalweg hemmende Verbindung, wobei die Komponente(n) in einem Individuum nicht als fremd angesehen wird(werden), sowie übliche Hilfsstoffe.
- 15 2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente (a) umfaßt:
- einen blockierenden, nicht-cytotoxischen anti-APO-1-Antikörper,
  - einen anti-APO-1-Antikörper ohne Fc-Teil, und
  - ein APO-1-Ligand-Analogon,
- 20 die Komponente (b) umfaßt:
- einen anti-APO-1-Ligand-Antikörper,
  - ein APO-1,
  - eine extrazelluläre APO-1-Domäne,
  - eine Verbindung mit mindestens einer extrazellulären APO-1-Domäne und einem Träger,
- 25 - ein eine APO-1-Ligand-Bindungsstelle aufweisendes Peptid, und  
- eine Verbindung mit mindestens einem eine APO-1-Ligand-Bindungsstelle aufweisenden Peptid und einem Träger, und
- 30 die Komponente (c) umfaßt:
- einen Hemmer von ICE, und
  - einen Hemmer von ICE Struktur-verwandten Proteasen.

3. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der ICE-Hemmer der Komponente (c) DCI, YVAD-CHO oder CrmA bzw. ein Derivat davon ist.

4. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die ICE Struktur-  
5 verwandte Protease der Komponente (c) Nedd-2/lch-1 oder priCE ist.

5. Mittel zur Hemmung von Apoptose bei einer mit einer HIV-Infektion assoziierten Erkrankung, dadurch gekennzeichnet, daß das Mittel nach einem der Ansprüche 1 - 4 ferner eine bis alle Komponenten enthalten kann, von:

- 10
- (a) eine den TAT-Rezeptor hemmende Verbindung,
  - (b) eine TAT-hemmende bzw. abfangende Verbindung,
  - (c) eine den intrazellulären TAT-Rezeptor-Signalweg hemmende Verbindung,
  - 15 (d) eine den CD4-Rezeptor hemmende Verbindung,
  - (e) eine gp120 hemmende bzw. abfangende Verbindung, und
  - (f) eine den intrazellulären CD4-Rezeptor-Signalweg hemmende Verbindung, wobei die Komponente(n) in einem Individuum nicht als fremd angesehen wird(werden).
- 20

6. Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente (a) umfaßt:

- einen anti-TAT-Rezeptor-Antikörper, und
- ein TAT-Analogon,

25 die Komponente (b) umfaßt:

- einen anti-TAT-Antikörper,
- einen TAT-Rezeptor,
- eine extrazelluläre TAT-Rezeptor-Domäne,
- 30 - eine Verbindung mit mindestens einer extrazellulären TAT-Rezeptor-Domäne und einem Träger,
- ein TAT-Bindungsstelle aufweisendes Peptid,

- eine Verbindung mit mindestens einem eine TAT-Bindungsstelle aufweisenden Peptid und einem Träger,
- eine TAT-Bindungsstelle auf Nukleinsäurebasis, und
- eine transdominante TAT-Mutante.

5

die Komponente (d) umfaßt:

- einen anti-CD4-Rezeptor-Antikörper, und
- ein gp120-Analogon, und

10

die Komponente (e) umfaßt:

- einen anti-gp120-Antikörper,
- einen CD4-Rezeptor,
- eine extrazelluläre CD4-Rezeptor-Domäne,
- eine Verbindung mit mindestens einer extrazellulären CD4-Rezeptor-Domäne und einem Träger,
- ein eine gp120-Bindungsstelle aufweisendes Peptid, und
- eine Verbindung mit mindestens einem eine gp120-Bindungsstelle aufweisenden Peptid.

15

20

7. Verbindung mit mindestens einer extrazellulären APO-1-Domäne und einem Träger, dadurch gekennzeichnet, daß die Domäne(n) und der Träger in einem Individuum nicht als fremd angesehen werden.

25

8. Verbindung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ein Protein ist.

9. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein ein Fc-Teil eines Antikörpers ist.

30

10. Verbindung nach einem der Ansprüche 8-9, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ein Fusionsprotein ist.

11. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 10, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

5 (a) Amplifikation einer DNA durch übliche PCR-Technik, wobei die DNA für mindestens eine extrazelluläre APO-1-Domäne und eine am 3'-Ende dieser angebrachte Bindungsregion codiert,

(b) Amplifikation einer DNA durch übliche PCR-Technik, wobei die DNA für einen Protein-Träger und eine am 5'-Ende des Protein-Trägers angebrachte Bindungsregion codiert,

10 (c) Vereinigung der amplifizierten DNAs von (a) und (b) und weitere gemeinsame Amplifikation dieser durch übliche PCR-Technik, wobei ein dem 5'-Ende der DNA der APO-1-Domäne entsprechender Primer und ein dem 3'-Ende der DNA des Protein-Trägers entsprechender Primer verwendet werden, wodurch ein amplifiziertes, beide DNAs in Fusion enthaltendes DNA-Fragment erhalten wird, und

15 (d) Insertion des DNA-Fragments von (c) in einen Expressionsvektor und Expression des DNA-Fragments in üblicher Weise.

20 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsregion von (a) und (b) eine Antikörper-Hinge-Region oder ein Teil davon ist.

13. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 7-10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Hemmung von Apoptose.

25 14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß ferner zur Herstellung des Arzneimittels eine bis alle Komponenten verwendet werden, von:

(a) eine APO-1-hemmende Verbindung

30 (b) eine weitere den APO-1 Ligand hemmende bzw. abfangende Verbindung, und

(c) eine den intrazellulären APO-1-Signalweg hemmende Verbindung, wobei die Komponente(n) in einem Individuum nicht als fremd ange-

sehen wird(werden).

15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente (a) umfaßt:

5

- einen blockierenden, nicht-cytotoxischen anti-APO-1-Antikörper,
- einen anti-APO-1-Antikörper ohne Fc-Teil, und
- ein APO-1-Ligand-Analogon, und

die Komponente (b) umfaßt:

10

- einen anti-APO-1-Ligand-Antikörper,
- ein APO-1,
- eine extrazelluläre APO-1-Domäne,
- ein eine APO-1-Ligand-Bindungsstelle aufweisendes Peptid, und
- eine Verbindung mit mindestens einem eine APO-1-Ligand-Bindungs-

15

stelle aufweisenden Peptid und einem Träger, und

die Komponente (c) umfaßt:

- einen Hemmer von ICE, und
- einen Hemmer von ICE Struktur-verwandten Proteasen.

20

16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der ICE-Hemmer der Komponente (c) DCI, YVAD-CHO oder CrmA bzw. ein Derivat davon ist.

25

17. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die ICE Struktur-verwandte Protease der Komponente (c) Nedd-2/Ich-1 oder priCE ist.

30

18. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 7-10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Hemmung von Apoptose bei einer mit einer HIV-Infektion assoziierten Erkrankung.

19. Verwendung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß ferner zur Herstellung des Arzneimittels eine bis alle Komponenten verwendet werden, von:

- 5 (a) eine APO-1 hemmende Verbindung,  
(b) eine weitere den APO-1-Ligand hemmende bzw. abfangende Verbindung,  
(c) eine den intrazellulären APO-1-Signalweg hemmende Verbindung,  
(d) eine den TAT-Rezeptor hemmende Verbindung,  
10 (e) eine TAT-hemmende bzw. abfangende Verbindung,  
(f) eine den intrazellulären TAT-Rezeptor-Signalweg hemmende Verbindung,  
(g) eine den CD4-Rezeptor hemmende Verbindung,  
(h) eine gp120 hemmende bzw. abfangende Verbindung, und  
15 (i) eine den intrazellulären CD4-Rezeptor-Signalweg hemmende Verbindung, wobei die Komponente(n) in einem Individuum nicht als fremd angesehen wird(werden).

20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß  
20 die Komponente (a) umfaßt:  
- einen blockierenden, nicht-cytotoxischen anti-APO-1-Antikörper,  
- einen anti-APO-1-Antikörper ohne Fc-Teil, und  
- ein APO-1-Ligand-Analogon,

- 25 die Komponente (b) umfaßt:  
- einen anti-APO-1-Ligand-Antikörper,  
- ein APO-1,  
- eine extrazelluläre APO-1-Domäne,  
- ein eine APO-1-Ligand-Bindungsstelle aufweisendes Peptid, und  
30 - eine Verbindung mit mindestens einem eine APO-1-Ligand-Bindungsstelle aufweisenden Peptid und einem Träger,



die Komponente (d) umfaßt:

- einen anti-TAT-Rezeptor-Antikörper, und
- ein TAT-Analogon,

5 die Komponente (e) umfaßt:

- einen anti-TAT-Antikörper,
- einen TAT-Rezeptor,
- eine extrazelluläre TAT-Rezeptor-Domäne,
- eine Verbindung mit mindestens einer extrazellulären TAT-Rezeptor-Domäne und einem Träger,
- ein eine TAT-Bindungsstelle aufweisendes Peptid,
- eine Verbindung mit mindestens einem eine TAT-Bindungsstelle aufweisenden Peptid und einem Träger,
- eine TAT-Bindungsstelle auf Nukleinsäurebasis, und
- 15 - eine transdominante TAT-Mutante,

die Komponente (g) umfaßt:

- einen anti-CD4-Rezeptor-Antikörper, und
- 20 - ein gp120-Analogon, und

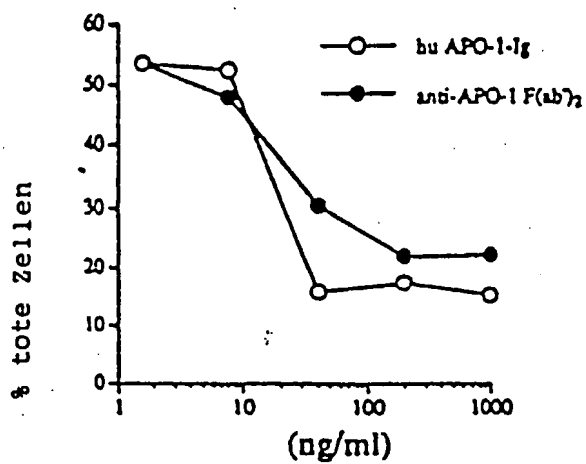
die Komponente (h) umfaßt:

- einen anti-gp120-Antikörper,
- einen CD4-Rezeptor,
- eine extrazelluläre CD4-Rezeptor-Domäne,
- 25 - eine Verbindung mit mindestens einer extrazellulären CD4-Rezeptor-Domäne und einem Träger,
- ein eine gp120-Bindungsstelle aufweisendes Peptid, und
- eine Verbindung mit mindestens einem eine gp120-Bindungsstelle aufweisenden Peptid.

30

1 / 5

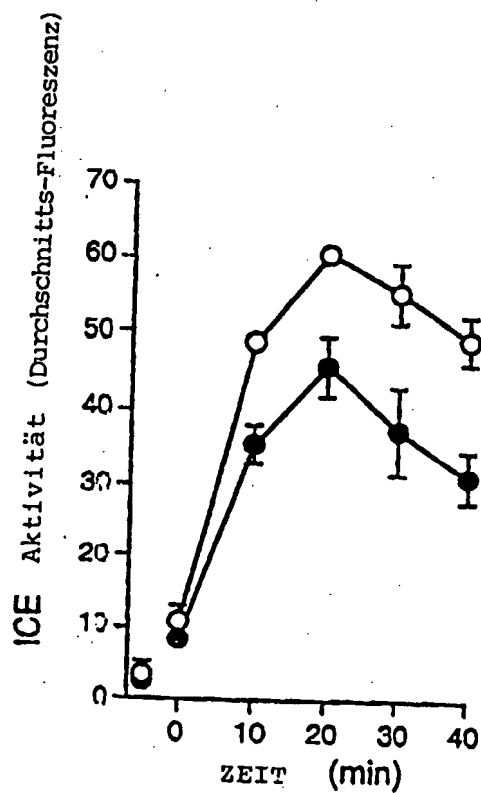
Hemmung der bei SKW6.4 Zellen  
mittels anti-APO-1-Antikörper (20 ng/ml)  
induzierten Apoptose durch  
hu APO-1-Ig bzw. anti-APO-1 F(ab')<sub>2</sub>.



FIGUR 1

Hemmung von Apoptose durch hu APO-1-Ig bzw. anti-APO-Ig(ab')<sub>2</sub>

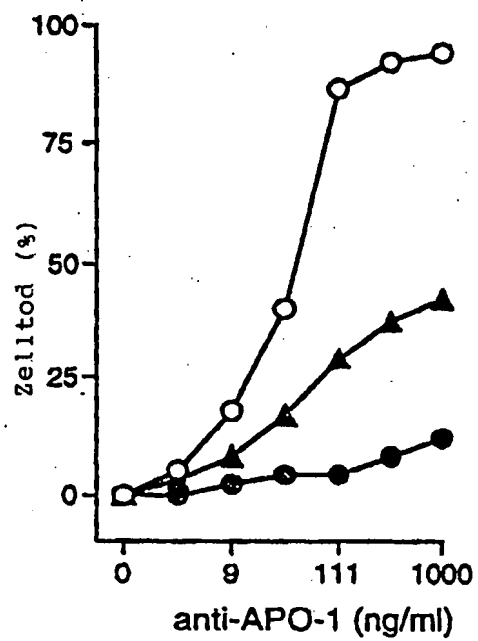
2 / 5



Figur 2a

Stimulierung der proteolytischen Aktivität von ICE durch einen anti-APO-1-Antikörper

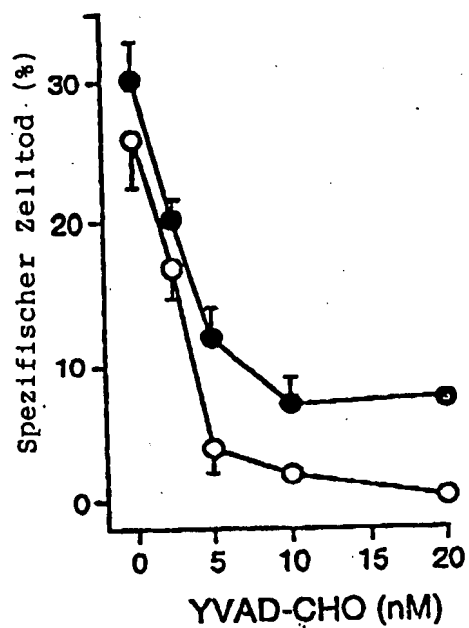
3 / 5



Figur 2b

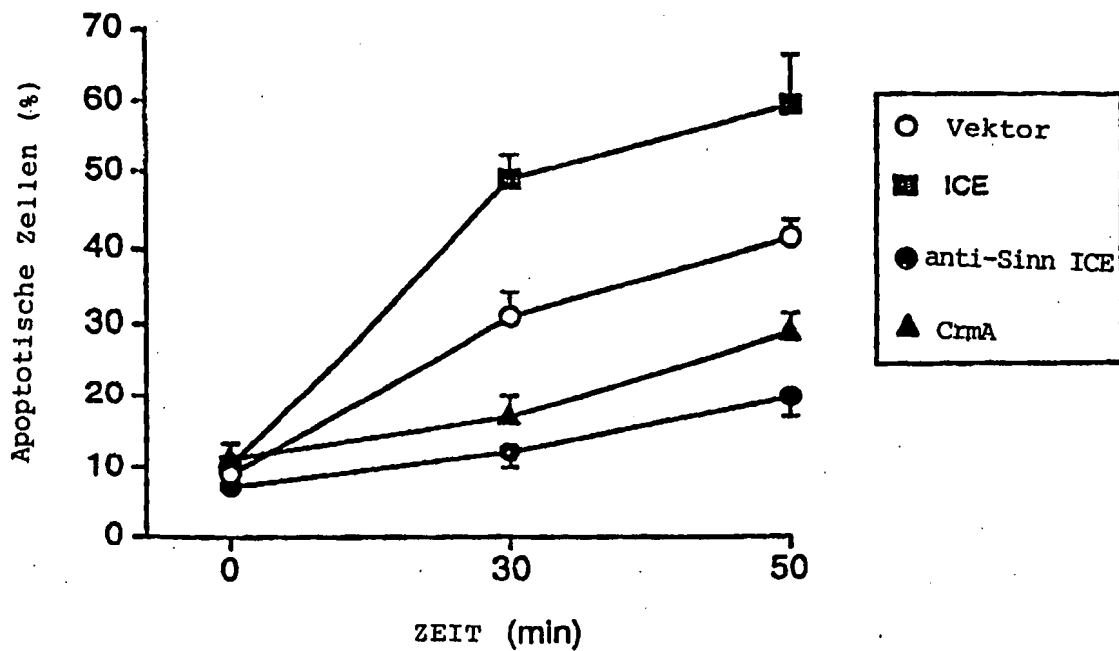
Hemmung von Apoptose durch DCI

4 / 5



Figur 2c

Hemmung von Apoptose durch YVAD-CHO



Figur 2d

Hemmung von Apoptose durch anti-Sinn ICE-bzw. CrmA-cDNA

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 95/00573

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/715 C07K16/28 C12N15/62 A61K39/395 A61K39/42  
A61K38/17 A61K38/55 A61K31/37 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CELL., vol.75, 19 November 1993, CAMBRIDGE, MA US pages 653 - 660 M. MIURA ET AL. 'INDUCTION OF APOPTOSIS IN FIBROBLASTS BY IL-1BETA-CONVERTING ENZYME, A MAMMALIAN HOMOLOG OF THE C. ELEGANS CELL DEATH GENE ced-3.' see the whole document --- -/--	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 June 1995

Date of mailing of the international search report

21.06.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 95/00573

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.149, no.10, 15 November 1992, BALTIMORE US pages 3166 - 3173 J. DHEIN ET AL. 'INDUCTION OF APOPTOSIS BY MONOCLONAL ANTIBODY ANTI-APO-1 CLASS SWITH VARIANTS IS DEPEDENT ON CROSS-LINKING OF APO-1 CELL SURFACE ANTIGENS.' cited in the application see page 3169, left column, line 1 - line 12</p> <p>---</p>	1-20
A	<p>THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol.179, no.3, 1 March 1994, NEW YORK, N.Y., US pages 873 - 879 T. SUDA ET AL. 'PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE FAS-LIGAND THAT INDUCES APOPTOSIS.' cited in the application see page 874, left column, line 16 - right column, line 18 see page 878, left column, line 1 - line 12 see page 878, right column, line 15 - line 18</p> <p>---</p>	1-20
A	<p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.146, no.12, 15 June 1991, BALTIMORE US pages 4325 - 4332 M.R.POSNER ET AL. 'AN IgG HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY THAT REACTS WITH HIV-1/GP120, INHIBITS VIRUS BINDING TO CELLS, AND NEUTRALIZES INFECTION.' see the whole document</p> <p>---</p>	1-20
A	<p>EP,A,0 344 006 (ORTHO PHARMACEUTICAL CORPORATION ET AL.) 29 November 1989 see the whole document</p> <p>---</p>	1-20
A	<p>WO,A,91 15224 (SMITH-KLINE BEECHAM CORPORATION) 17 October 1991 see page 5, line 6 - line 27; claims</p> <p>---</p>	1-20
P,A	<p>CELL., vol.78, 29 July 1994, CAMBRIDGE, NA US pages 343 - 352 N.P.C. WALKER ET AL. 'CRYSTAL STRUCTURE OF THE CYSTEINE PROTEASE INTERLEUKIN-1BETA-CONVERTING ENZYME: A (P20/P10)2 HOMODIMER.' see page 343, right column, line 19 - line 43; figure 4</p> <p>-----</p>	1-20



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter. Appl. No.

PCT/EP 95/00573

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0344006	29-11-89	AU-B- 626865	13-08-92
		AU-A- 3526689	30-11-89
		JP-A- 2131497	21-05-90
-----			
WO-A-9115224	17-10-91	AU-A- 7677891	30-10-91
		EP-A- 0522081	13-01-93
-----			

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen  
PCT/EP 95/00573

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K14/715 C07K16/28 C12N15/62 A61K39/395 A61K39/42  
A61K38/17 A61K38/55 A61K31/37 A61K31/70

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CELL., Bd.75, 19. November 1993, CAMBRIDGE, NA US Seiten 653 - 660 M. MIURA ET AL. 'INDUCTION OF APOPTOSIS IN FIBROBLASTS BY IL-1BETA-CONVERTING ENZYME, A MAMMALIAN HOMOLOG OF THE C. ELEGANS CELL DEATH GENE ced-3.' siehe das ganze Dokument --- -/--	1-20

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"B" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. Juni 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

21-06-1995

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ryckebosch, A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen  
PCT/EP 95/00573

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY., Bd.149, Nr.10, 15. November 1992, BALTIMORE US Seiten 3166 - 3173 J. DHEIN ET AL. 'INDUCTION OF APOPTOSIS BY MONOCLONAL ANTIBODY ANTI-APO-1 CLASS SWITH VARIANTS IS DEPEDENT ON CROSS-LINKING OF APO-1 CELL SURFACE ANTIGENS.' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 3169, linke Spalte, Zeile 1 - Zeile 12</p> <p>---</p>	1-20
A	<p>THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, Bd.179, Nr.3, 1. März 1994, NEW YORK, N.Y., US Seiten 873 - 879 T. SUDA ET AL. 'PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE FAS-LIGAND THAT INDUCES APOPTOSIS.' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 874, linke Spalte, Zeile 16 - rechte Spalte, Zeile 18 siehe Seite 878, linke Spalte, Zeile 1 - Zeile 12 siehe Seite 878, rechte Spalte, Zeile 15 - Zeile 18</p> <p>---</p>	1-20
A	<p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY., Bd.146, Nr.12, 15. Juni 1991, BALTIMORE US Seiten 4325 - 4332 M.R.POSNER ET AL. 'AN IgG HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY THAT REACTS WITH HIV-1/GP120, INHIBITS VIRUS BINDING TO CELLS, AND NEUTRALIZES INFECTION.' siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-20
A	<p>EP,A,0 344 006 (ORTHO PHARMACEUTICAL CORPORATION ET AL.) 29. November 1989 siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-20
A	<p>WO,A,91 15224 (SMITH-KLINE BEECHAM CORPORATION) 17. Oktober 1991 siehe Seite 5, Zeile 6 - Zeile 27; Ansprüche</p> <p>---</p>	1-20
P,A	<p>CELL., Bd.78, 29. Juli 1994, CAMBRIDGE, NA US Seiten 343 - 352 N.P.C. WALKER ET AL. 'CRYSTAL STRUCTURE OF THE CYSTEINE PROTEASE INTERLEUKIN-1BETA-CONVERTING ENZYME: A (P20/P10)2 HOMODIMER.' siehe Seite 343, rechte Spalte, Zeile 19 - Zeile 43; Abbildung 4</p> <p>-----</p>	1-20

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/00573

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0344006	29-11-89	AU-B- 626865	13-08-92
		AU-A- 3526689	30-11-89
		JP-A- 2131497	21-05-90
-----			
WO-A-9115224	17-10-91	AU-A- 7677891	30-10-91
		EP-A- 0522081	13-01-93
-----			